

Japanese Patent Laid-Open No. 11-290094

(71) Applicant: 000004341

Nippon Oil & Fats Co., Ltd.

4-20-3, Ebisu, Shibuya-ku, Tokyo

(54) [Title of the Invention]

PRODUCTION METHOD OF ASTAXANTHIN FATTY ACID ESTERS

(57) [Abstract]

[Problem to be Solved]

To provide a production method of astaxanthin fatty acid diesters.

[Solution]

A production method of astaxanthin fatty acid diesters characterized in that a lipase is used in performing esterification reaction using astaxanthin and a fatty acid.

[Claims for the Patent]

[Claim 1]

A production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester characterized in that a lipase is used in performing esterification reaction using astaxanthin and a fatty acid.

[Claim 2]

The production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester according to claim 1 wherein said fatty acid is a linear or branched, saturated or unsaturated fatty acid having 14 to 22 carbon atoms.

[Claim 3]

The production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester according to claim 1 or 2 wherein one or more selected from lipases derived from microorganisms of genus *Candida*, lipases derived from microorganisms of genus *Chromobacterium* and lipases derived from animal pancreas are used.

[Claim 4]

A production method of an astaxanthin fatty acid diester characterized in that a lipase is used in performing esterification reaction using an astaxanthin fatty acid monoester and a fatty acid.

[Claim 5]

The production method of an astaxanthin fatty acid diester according to claim 4 wherein said fatty acid is a linear or branched, saturated or unsaturated fatty acid having 14 to 22 carbon atoms.

[Claim 6]

The production method of an astaxanthin fatty acid diester according to claim 4 or 5 wherein one or more selected from lipases derived from microorganisms of genus *Candida*, lipases derived from microorganisms of genus *Chromobacterium* and lipases derived from animal pancreas are used.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester. More specifically, the present invention relates to a production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester characterized in that the production is conducted by using a lipase in performing esterification reaction using free astaxanthin or an astaxanthin fatty acid monoester and a fatty acid.

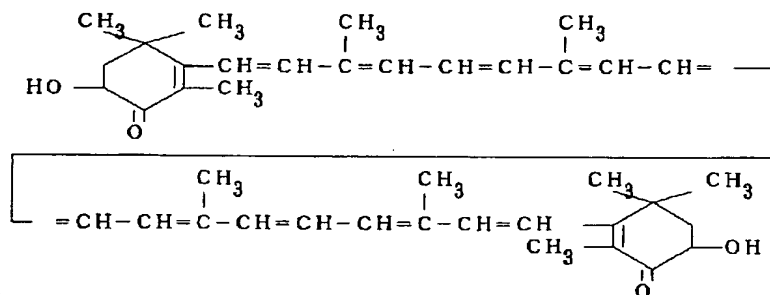
[0002]

[Conventional Art]

Astaxanthin is generally a pigment represented by the following formula [1].

[0003]

[Formula 1]



... [1]

[0004]

It has been disclosed that astaxanthin is used for food, pharmaceutical agents and cosmetics (Japanese Patent Laid-Open No. 8-245335), color tone-improving agents for cultured fish such as red sea bream, salmon, trout, young yellowtail fish

(Japanese Patent Laid-Open No. 49-79895, Japanese Patent Laid-Open No. 57-58860, Japanese Patent Laid-Open No. 4-349856) and so on. It has been recently reported that astaxanthin has functions such as an antioxidant function (Japanese Patent Laid-Open No. 2-49091), an effect of eliminating active oxygen free radical (Japanese Patent Laid-Open No. 6-145062), an antitumor effect (Carcinogenesis, Vol. 15, page 15, 1994), an antistress effect (Japanese Patent Laid-Open No. 9-124470). Astaxanthin accumulates in crustaceans such as krill, shrimps and crabs, spawns such as salmon roe, yeasts, algae, genetic modified microorganisms (Bioscience and Industry, Vol. 53, page 1036, 1995), etc. As production methods of astaxanthin, methods of extracting from shells of crustaceans with a solvent (Japanese Patent Laid-Open No. 58-88353, Japanese Patent Laid-Open No. 9-301950), a method of extracting from krill oil in a supercritical state (Japanese Patent Laid-Open No. 60-35057, Japanese Patent Laid-Open No. 60-4558, Japanese Patent Laid-Open No. 6-200179), a method of solvent extraction from Phaffia yeast (Monthly Food Chemical 1994 (November issue), page 63, 1994, Food Industry 1994 (December issue), page 30 and page 47, Japanese Patent Laid-Open No. 8-283) and so on are known. In addition, chemical synthetic process of astaxanthin is disclosed by Japanese Patent Laid-Open No. 52-68157, Japanese Patent Laid-Open No. 55-388, Japanese Patent Laid-Open No. 5-65290, etc.

[0005]

Astaxanthin accumulated in organisms is present as free astaxanthin to which no fatty acid is linked, an astaxanthin fatty acid monoester to which one molecule of a fatty acid is

linked through an ester bond or an astaxanthin fatty acid diester to which two molecules of fatty acids are linked. For example, krill and American crawfish have free astaxanthin or astaxanthin fatty acid di- or mono-esters whereas almost all astaxanthin produced by organisms such as *Phaffia* or *haematococcus* is free astaxanthin (Food and Development Vol. 27 (No. 3), page 38, 1992). As for stability against oxygen, heat and/or light, astaxanthin fatty acid di- or mono-esters are more stable than free astaxanthin. As for absorption efficiency in the enteric canal, astaxanthin fatty acid di- or mono-esters are superior to free astaxanthin {Food and Development Vol. 27 (No. 3), page 38, 1992}. Ability of eliminating singlet oxygen and activity of trapping/eliminating free radicals and active oxygen are exhibited only in free astaxanthin, and astaxanthin fatty acid diester does not have such an effect {Food Style 21. Vol. 1, page 73, 1997}. Astaxanthin fatty acid di- or mono-esters are, however, hydrolyzed by enzymes when absorbed at the enteric canal and turns to free astaxanthin in a body, which exhibits effects of eliminating singlet oxygen and trapping/eliminating active oxygen {Food and Development, Vol. 27 (No. 3), page 38, 1992}. Ester types are superior to oils and fats in solubility. Whereas free astaxanthin can dissolve by around 50 ppm, ester type astaxanthins can easily dissolve by around 100 ppm, the latter widens application to foods and pharmaceutical agents. On this account, it is considered that there is no problem in orally taking astaxanthin fatty acid diester expecting antioxidant effect of astaxanthin in the living bodies at all.

[0006]

Astaxanthin fatty acid diester is useful as above, and have a high stability as well as good absorption efficiency and application in the field of pharmaceutical agents and food can be expected but there are few reports about the production process thereof. As a method of fractionating to produce a fatty acid ester of astaxanthin from natural resources, there is known, for example, a method of fractionation by high performance liquid chromatography (hereinbelow abbreviated as HPLC) from krill extract (Japanese Patent Laid-Open No. 7-300421) but in this case, odor coming from krill cannot be removed and the above astaxanthin fatty acid ester is unfavorable as raw materials of food, pharmaceutical agents and cosmetics. When an astaxanthin fatty acid diester fractionated by HPLC is subjected to a method of steam distillation or known deodorization methods using adsorbents such as active carbon and/or activated soil, astaxanthin is decomposed or adsorbed, leading to remarkable decrease in the content thereof and the effect cannot be exhibited sufficiently. When astaxanthin derived from microorganisms is extracted, there is caused a problem that extraction efficiency of astaxanthin is poor since it is necessary to crush the cell walls of the microorganisms. In addition, almost all of the contained astaxanthin is free astaxanthin, which is not suitable as raw materials for obtaining astaxanthin fatty acid di- or mono-esters. Further, while a number of reports on chemical synthetic process of free astaxanthin have been made, there is no report on chemical synthetic process of astaxanthin fatty acid di- or mono-esters.

[0007]

[Problems to be Solved by the Invention]

The object of the present invention is to provide a method of efficiently synthesizing diester type astaxanthins which can be expected to be applied in the field of pharmaceutical agents and food and which have high stability and absorption efficiency.

[0008]

[Means for Solving the Problems]

The present inventors have intensively conducted synthetic process of astaxanthin fatty acid diesters in consideration of the above problems, and consequently have found that use of a lipase, which is an enzyme, enables synthesis with good yield in the synthesis of astaxanthin fatty acid diesters from a fatty acid and free astaxanthin or an astaxanthin fatty acid monoester, and thus completed the present invention. That is, the present invention is the following (1) to (6).

(1) A production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester characterized in that a lipase is used in performing esterification reaction using astaxanthin and a fatty acid.

(2) The production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester wherein the fatty acid is a linear or branched, saturated or unsaturated fatty acid having 14 to 22 carbon atoms.

(3) The production method of an astaxanthin fatty acid monoester or an astaxanthin fatty acid diester wherein one or more selected from lipases derived from microorganisms of genus *Candida*, lipases derived from microorganisms of genus

Chromobacterium and lipases derived from animal pancreas are used.

(4) A production method of an astaxanthin fatty acid diester characterized in that a lipase is used in performing esterification reaction using an astaxanthin fatty acid monoester and a fatty acid.

(5) The production method of an astaxanthin fatty acid diester wherein the fatty acid is a linear or branched, saturated or unsaturated fatty acid having 14 to 22 carbon atoms.

(6) The production method of an astaxanthin fatty acid diester wherein one or more selected from lipases derived from microorganisms of genus Candida, lipases derived from microorganisms of genus Chromobacterium and lipases derived from animal pancreas are used in performing esterification reaction using an astaxanthin fatty acid monoester and a fatty acid.

[0009]

[Embodiments of the Invention]

Astaxanthin used as raw materials in the present invention may be free astaxanthin or an astaxanthin fatty acid monoester, and it may be a single compound or a mixture of the both. Free astaxanthin may be a compound obtained by chemical synthesis or a natural product obtained by extraction as mentioned above may be used. As for naturally occurring astaxanthin, free astaxanthin or astaxanthin fatty acid monoesters include astaxanthin derived from oils and fats produced by microorganisms such as Phaffia and haematococcus, and besides astaxanthins fraction extracted from crustaceans such as krill, shrimps and crabs as well as spawns. In addition, mixtures

respectively containing free astaxanthin, a fatty acid monoester and a fatty acid diester of astaxanthin produced by the above-mentioned microorganisms and crustaceans can be used.

[0010]

The raw material fatty acid used in the present invention is preferably a linear or branched, saturated or unsaturated fatty acid having 14 to 22 carbon atoms. Specific examples thereof include fatty acids selected from palmitic acid, iso palmitic acid, stearic acid, palmitoleic acid, oleic acid, vaccenic acid, elaidic acid, linoleic acid, α -linolenic acid, γ -linolenic acid (γ -LN), conjugate linoleic acid (CLA), bishomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA), etc. or mixtures of two or more kinds of fatty acids. Furthermore, oils by microorganisms such as genus Entomophthoracea, marine microalgae (genus Isochrysis) and Mucor (genus Mortierella); vegetable oils such as olive oil, rapeseed oil, safflower oil, sunflower oil and corn oil; marine animal oils such as sardine oil, bonito oil, tuna oil, whale oil, cuttlefish liver oil, cod liver oil, dogfish liver oil and spawn oil; or mixed fatty acids obtained by purifying and condensing egg yolk oil and purified fatty acids.

[0011]

As the lipase usable in the present invention, preferred are lipases derived from microorganisms of genus Candida {lipase derived from Candida cyndracea (Meito Sangyo Co., Ltd., product name: Lipase OF), lipase derived from Candida Antaretica (Novo Industry Co., Ltd., product name: Lipase SP382)}, lipases

derived from microorganisms of genus *Chromobacterium* {lipase derived from *Chromobacterium viscosum*, Asahi Chemical Industry Co., Ltd., product name: Lipase AC}, lipases derived from animal pancreas, etc. As lipases of derived from microorganisms, lipases derived from mould fungi (*Aspergillus niger*) and those of genus *Pseudomonas* are included in addition to the above. As lipases derived from animal pancreas, commercially available products by Aldrich Corporation derived from pig pancreas are included. Either one of or two or more kinds of lipases selected from these lipases may be used.

[0012]

As the lipase to be used by the present invention, lipases immobilized on powders or carriers can be used. The immobilization of lipases is conducted following conventional methods, and conventional carriers such as silica gel, celite, κ-carrageenan, chitin, sodium alginate {Bioreactor, supervised/edited by Saburo Fukui, Kodansha Scientific (1985), Jissen Bioreactor (Practice in Bioreactor), edited by Food Industry Bioreactor System Technique Study Association, Shokuhin-Kagaku Shimbun (1990)} are used as immobilizing carriers.

[0013]

The molar ratio of astaxanthin and a fatty acid to be used in the present invention is 2 to 20 times, preferably 5 to 10 times as a fatty acid to free astaxanthin. When it is less than 2 times mole, high content of astaxanthin fatty acid diesters cannot be attained and when it is increased to more than 20

times mole, remarkable improvement in the effect cannot be expected and therefore such ratios are not preferable.

[0014]

The amount of lipases to be used in the present invention is 100 u (= unit)/mmol to 5000 u/mmol, preferably 500 to 3000 u/mmol. When it is less than 100 u/mmol, astaxanthin fatty acid diesters cannot be obtained at a high yield, and when more than 5000 u/mmol is used, remarkable improvement in the effect cannot be expected and therefore such amounts are not preferable.

[0015]

The reaction temperature of the esterification reaction of the present invention is preferably 20 to 50°C. It is inherently preferable that enzymatic reactions are performed under conditions such as optimum temperature or optimum pH which respective enzyme lipase has. However, reaction temperature higher than 50°C is not preferable because deterioration of raw material free astaxanthin used in the reaction is accelerated. In the meantime, the reaction temperature lower than 20°C decreases activity of lipases, the reaction rate reduces and therefore such temperatures are not preferable.

[0016]

Organic solvents may be used at the time of the reaction in the present invention. Non-polar solvents are preferable from the viewpoint of stability of lipases at the time of the reaction. Specific examples thereof include n-hexane, benzene and tetrachloromethane. Although these solvents can be used, n-hexane is preferable from the viewpoint of safety such as toxicity. When saturated fatty acids having a high melting point

such as palmitic acid and stearic acid are used for the reaction in particular, it is effective.

[0017]

For the reaction time of the enzyme reaction to be performed in the present invention, 12 hours to 48 hours are desirable. When the reaction time is shorter than 12 hours, the reaction does not sufficiently proceed and when the reaction time exceeds 48 hours, astaxanthin fatty acid diesters having remarkable improved purity cannot be obtained, and accordingly, such a reaction time is not preferable. The reaction may be preferably performed under an inert gas stream such as nitrogen and argon to prevent oxidation deterioration reaction of fatty acids and astaxanthin in the present invention.

[0018]

Since the reaction in the present invention is a reversible equilibrium reaction, water which generates with progress of the reaction will be a factor which inhibits the reaction. As for the water content at the time of the reaction, 200 ppm to 1000 ppm is desirable in the present invention. When the water content is more than 1000 ppm, main reaction shifts from synthetic reaction to decomposition reaction and the purity of the astaxanthin fatty acid diesters is lowered and accordingly such a content is not preferable. When the water content is less than 200 ppm, hydration water which lipases have for stability will be removed, leading to inactivation of lipases and accordingly such a content is not preferable. It is preferable to perform bubbling with an inert gas or evaporation under vacuum when no organic solvent is used or alternatively to

perform adsorption treatment with molecular sieves or the like when an organic solvent is used so as to remove water by-product.
[0019]

[Advantages of the Invention]

According to the production method of astaxanthin fatty acid esters of the present invention, in which a lipase is used, reaction can be conducted under a mild condition and fatty acid esters of astaxanthin can be produced with a high yield without causing decomposition of the raw material astaxanthin and so on.
[0020]

[Examples]

Hereinbelow, the present invention is described in detail by way of examples. Measuring methods used are shown below.

<Measuring method of lipase activity without carriers>

Ester synthesis activity of lipase was determined by the following method. 100 μ L of an enzyme aqueous solution was added to a mixed solution of 1 mol of oleic acid {purity 99%: Extra Olein produced by Nippon Oil & Fats Co., Ltd.} and 1 mol of glycerin containing 10% of water and stirred and mixed at 500 rpm at 37°C for 10 minutes. The activity was calculated from the decrement of the oleic acid. The activity consuming 1 μ mol of oleic acid for one minute is assumed as 1 u (= unit).

<Measuring method of immobilized lipase activity>

Ester synthesis activity of lipase was determined by the following method. 10 mL of n-hexane was dissolved in a mixed solution of 1 mol of oleic acid {purity 99%: Extra Olein

produced by Nippon Oil & Fats Co., Ltd.) and 1 mol of glycerin containing 10% of water and supplemented with 1 g of immobilized lipase and stirred and mixed at 500 rpm at 37°C for 10 minutes. The activity was calculated from the decrement of the oleic acid. The activity consuming 1 μ mol of oleic acid for one minute is assumed as 1 u (= unit).

<Analysis method of astaxanthin>

The analysis of astaxanthin content was performed with high performance liquid chromatography under conditions shown below.

Machine type: high performance liquid chromatography
{hereinbelow abbreviated as HPLC, 8020 system produced by Tosoh Corp. equipped with Hibar column LiChrosorb Si 60 column produced by Cica-Merck Company};

Mobile phase: n-hexane: ethyl acetate: acetic acid = 50:50:1
(v:v:v)

Flow rate: 2 ml/min

Detection method: UV-visible absorption spectrum at 492 nm.

As a result of analysis under the above conditions, astaxanthin fatty acid diester, astaxanthin fatty acid monoester and free astaxanthin are respectively detected in the vicinity of 2.3, 3.9 and 5.2 minutes in retention time. The total peak area of these three kinds of astaxanthin is assumed as 100% by weight, and respective peak area ratio was calculated as respective composition ratio (% by weight) of astaxanthin fatty acid diester, astaxanthin fatty acid monoester and free astaxanthin. Ester synthesis activity of enzyme lipases used in the examples was shown in Table 1.

[0021]

[Table 1]

Table 1

Abbreviation of lipase		OF	SP	AC	Panc.
Product name or commercial product		Lipase OF	Lipase SP 382	Lipase AC	Lipase II
Manufacturer or distributor		Meito Sangyo Co., Ltd.	Novo Industries, Ltd.	Asahi Kasei Industries, Ltd.	Aldrich
Origin of enzyme		Candida Cylindracea	Candida Antaretica	Chromo-bacterium viscosum	Porcine pancreas
Ester synthesis activity (u)		3800	300	2000	1500
Carrier (note 1*)	Presence	Contained	Contained	None	None
	Kind	Chitopearl	Unknown**	Celite	Celite

Note 1*: Both of those containing carriers and not containing carriers are shown.

** : Commercial product in which the kind of carrier is not known.

Note: Both of those containing carriers and not containing carriers are shown.

As for those containing carriers, immobilized lipases were prepared by the following method.

<Lipase immobilized on celite>

Lipase having a weight corresponding to 1000 u synthesis activity measured by the above method was dissolved in 20 ml of purified water. This lipase aqueous solution was mixed with 100 g of Celite 535 (produced by Kanto Chemical Corporation Co., Ltd.) and immobilized. After immobilization, the mixture of the

lipase aqueous solution and celite was air dried at 25°C for two days and then dried under vacuum for eight hours to prepare immobilized lipase.

<Lipase immobilized on Chitopearl>

50 g (wet weight) of Chitopearl was suspended in 400 ml of 12% glutaraldehyde and stirred and mixed at 0°C for 60 minutes. After glutaraldehyde was washed away with sufficient amount of purified water, an aqueous solution in which lipase having a weight corresponding to 1000 u synthesis activity measured by the above method was dissolved in 100 ml of purified water was admixed and stirred at 37°C for 30 minutes to conduct immobilization. After immobilization, the mixture containing the lipase was air dried at 25°C for two days and then dried under vacuum for eight hours to prepare immobilized lipase.

[0022]

Example 1

0.12 g (0.2 mmol) of free astaxanthin (Roche Corporation) and 0.282 g (1.0 mmol) of oleic acid as a free fatty acid were weighed in a glass bottle for reaction. 500 u of Lipase OF derived from genus *Candida* was added thereto and reaction was conducted while the solution was stirred and mixed. This solution was sampled 24, 48 hours later after the reaction was conducted and the composition ratio of astaxanthin was analyzed by HPLC. The results are shown in Table 2.

[0023]

Examples 2 to 8

Reactions were conducted following Example 1 except that conditions such as addition amount of free astaxanthin, kind and addition amount of free fatty acid, kind and addition amount of lipase used, immobilization or unimmobilization, presence or absence of solvent used and reaction temperature were changed, and the composition ratio of astaxanthin was analyzed by HPLC. The results are shown in Tables 2 and 3.

[0024]

Examples 9

20 g of an astaxanthin solution (note 1: product of Nippon Chelate Company) of the following composition extracted from shrimp shells and 100 ml of n-hexane were weighed in a glass vessel for reaction, 2000 u of Lipase SP382 was added thereto and the mixture was warmed to 40°C and stirred. This astaxanthin-hexane solution was sampled 24, 48 hours later and the composition ratio of astaxanthin was analyzed by HPLC. Note 1: Astaxanthin solution: The weight ratio of astaxanthin is about 0.2% of the total liquid. The composition ratio of astaxanthin was 25% by weight of astaxanthin fatty acid diester, 5% by weight of astaxanthin fatty acid monoester and 70% by weight of free astaxanthin. About 85% by weight of free fatty acid and about 15% by weight of triglyceride are contained in addition to the astaxanthins.

[0025]

[Table 2]

Table 2

			Examples				
			1	2	3	4	5
Reaction condition	Astaxanthin (a) (mmol)		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Kind and amount of fatty acid (b) (mmol)		OA 1.0 (99%)*	LA 2.0 (99%)*	EPA 1.0 (99%)*	DHA 2.0 (95%)*	γ -LNA 3.0 (90%)*
	Kind and activity of lipase		OF 500	OF 1000	SP 500	SP 3000	AC 2000
	Carrier of lipase		None	Chitopearl	Unknown	Unknown	Celite
	Kind and amount (ml) of solvent		None	N-hexane 20	N-hexane 30	N-hexane 50	N-hexane 30
	Molar ratio (a/b)		2/10	2/20	2/10	2/20	5/30
	Presence of nitrogen gas		Yes	No	No	No	No
	Reaction temperature (°C)		40	25	30	40	50
Analyzed results (%)	Contents after 24 hours	Diester	50	49	22	32	38
		Monoester	16	4	36	27	19
		Astaxanthin	34	47	42	41	43
	Contents after 48 hours	Diester	61	55	53	56	57
		Monoester	8	2	7	10	1
		Astaxanthin	31	43	40	34	42

Note* Purity of fatty acid is shown.

[0026]

[Table 3]

Table 3

			Examples			
			6	7	8	9
Reaction condition	Astaxanthin (a) (mmol)		0.5	0.5	0.5	0.07
	Kind and amount of fatty acid (b) (mmol)		AA 5.0 (90%)*	PA 3.0 (95%)*	CO 5.0 (99%)*	SH** 2.0
	Kind and activity of lipase		AC 3000	Panc. 1000	Panc. 2000	AC 200
	Carrier of lipase		None	None	Celite	Unknown
	Kind and amount (ml) of solvent		None	N-hexane 50	N-hexane 30	N-hexane 100
	Molar ratio (a/b)		5/50	5/30	5/50	7/567
	Presence of nitrogen gas		Yes	No	No	No
	Reaction temperature (°C)		45	35	35	40
Analyzed results (%)	Contents after 24 hours	Diester	46	29	27	45
		Monoester	15	35	38	31
		Astaxanthin	39	36	35	24
	Contents after 48 hours	Diester	56	49	52	67
		Monoester	11	15	25	13
		Astaxanthin	33	36	23	20

Note: *Purity of fatty acid is shown.

: **Fatty acid derived from oil and fats extracted from shrimp shells

[0027]

Note*: The abbreviation of fatty acids are as follows.

OA: oleic acid, LA: linoleic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, γ -LNA: γ -linolenic acid, AA: arachidonic acid, PA: palmitic acid, CO: free fatty acid prepared from corn oil

[0028]

Comparative Example 1

0.12 g (0.2 mmol) of free astaxanthin (Roche Corporation), 0.282 g (1.0 mmol) of oleic acid as a free fatty acid and 50 ml of n-hexane were weighed in a glass bottle for reaction. 0.1 g of p-toluenesulfonic acid (PTS) was added thereto as an ordinary esterification catalyst and reaction was performed while the mixture was stirred at 40°C. This solution was sampled 48 hours after the reaction was conducted and the composition ratio of astaxanthin was analyzed by HPLC. As a result, no peak was detected in the vicinity of 2.3 and 3.9 minutes in retention time which correspond to astaxanthin fatty acid diesters and astaxanthin fatty acid monoesters. Only a peak was detected at 5.2 minutes in retention time corresponding to raw material astaxanthin.

[0029]

Comparative Example 2

0.12 g (0.2 mmol) of free astaxanthin (Roche Corporation), 0.282 g (1.0 mmol) of oleic acid as a free fatty acid and 50 ml of n-hexane were weighed in a glass bottle for reaction. 0.1 g of p-toluenesulfonic acid (PTS) was added thereto as an ordinary esterification catalyst and reaction was performed while the mixture was heated to reflux at 68 to 70°C. This solution was sampled 8 hours after the reaction was conducted and the composition ratio of astaxanthin was analyzed by HPLC. As a result, no peak was detected in the vicinity of 2.3, 3.9 and 5.2 minutes in retention time which correspond to astaxanthin fatty acid diesters, astaxanthin fatty acid monoesters and free

astaxanthin. After the reaction ended, astaxanthin was extracted and the concentration thereof was measured, which revealed that astaxanthin decreased to 21% by weight of the addition amount before the reaction.

[0030]

Example 10

0.12 g (0.2 mmol) of free astaxanthin (Roche Corporation) and 0.282 g (1.0 mmol) of oleic acid as a free fatty acid were weighed in a glass bottle for reaction. 500 u of Lipase OF derived from genus *Candida* was added thereto and reaction was performed while the solution was stirred and mixed. This solution was sampled 12 hours after the reaction was conducted and only the fatty acid monoester of astaxanthin was taken out by HPLC. The fatty acid monoester of astaxanthin was used and supplemented with 500 u of Lipase OF and reaction was performed for further 24 hours and the analysis was performed as above. As a result, the astaxanthin fatty acid diester was present in 80% by weight.

[0031]

It has been understood from the above results that the method of the present invention which uses a lipase in the reaction enables synthesis of astaxanthin fatty acid diesters with a good yield.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-290094

(43) 公開日 平成11年(1999)10月26日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 P 23/00

識別記号

F I

C 1 2 P 23/00

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-93439

(22) 出願日 平成10年(1998) 4 月 6 日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 田中 幸久

茨城県つくば市梅園 2-24-5

(72) 発明者 日比野 英彦

東京都練馬区旭丘 2-22-1

(54) 【発明の名称】 アスタキサンチン脂肪酸エステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 アスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 アスタキサンチンと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際して、リパーゼを用いることを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸をジエステルの製造方法。

【特許請求の範囲】

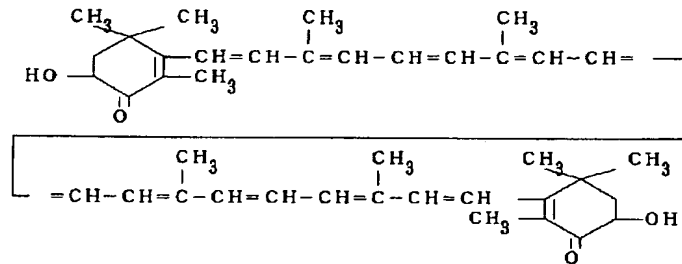
【請求項1】アスタキサンチンと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際してリパーゼを用いることを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【請求項2】前記の脂肪酸が炭素数14～22の直鎖または分岐の飽和もしくは不飽和の脂肪酸である請求項1記載のアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【請求項3】リパーゼがカンジダ属の微生物由来のリパーゼ、クロモバクテリウム属の微生物由来のリパーゼ、動物の脾臓由来のリパーゼから選ばれる1種以上を用いる請求項1または2のいずれか1項に記載のアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【請求項4】アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際してリパーゼを用いることを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【請求項5】前記の脂肪酸が炭素数14～22の直鎖または分岐の飽和もしくは不飽和の脂肪酸である請求項4＊



・・・[1]

【0004】で示される色素である。アスタキサンチンは食品や医薬品・化粧料（特開平8-245335号公報）及びマダイ、サケ、マス、ハマチなどの養殖魚の色揚げ剤（特開昭49-79895号公報、特開昭57-58860号公報、特開平4-349856号公報）などに使用することが開示されている。最近、アスタキサンチンには、酸化防止機能（特開平2-49091号公報）、活性酸素フリーラジカルの消去作用（特開平6-145062号公報）、抗腫瘍効果（Carcinogenesis, 第15巻, 第15頁, 1994年）、抗ストレス（特開平9-124470号公報）などの機能があることが報告されている。これらアスタキサンチンは、オキアミ、エビ、カニなどの甲殻類やイクラなどの魚卵及び酵母や藻類あるいは遺伝子組み替え微生物（バイオサイエンスとインダストリー, 第53巻, 第1036頁, 1995年）などの体内に蓄積している。アスタキサンチンの製造方法としては甲殻類の殻より溶剤を用いて抽出する方法（特開昭58-88353号公報、特開平9-301950号公報）、オキアミ油から超臨界状

＊記載のアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【請求項6】リパーゼがカンジダ属の微生物由来のリパーゼ、クロモバクテリウム属の微生物由来のリパーゼ、動物の脾臓由来のリパーゼから選ばれる1種以上を用いる請求項4または5に記載のアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法に関する。更に詳細には遊離アスタキサンチンまたはアスタキサンチン脂肪酸モノエステルと脂肪酸とを用いてエステル化を行うに際して、リパーゼを用いて製造することを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アスタキサンチンは一般には次式[1]

【0003】

【化1】

態で抽出する方法（特開昭60-35057号公報、特開昭60-4558号公報、特開平6-200179号公報）およびファフィア酵母などから溶剤抽出する方法（月刊フードケミカル1994年（11月号）、第63頁、1994年、食品工業1994年、（12月号）第30頁、第47頁、特開平8-283号公報）などが知られている。また、アスタキサンチンの化学的な合成法は、特開昭52-68157号公報、特開昭55-388号公報、特開平5-65290号公報などに開示されている。

【0005】生物中に蓄積されたアスタキサンチンは脂肪酸が結合していない遊離アスタキサンチンあるいは1分子の脂肪酸がエステル結合しているアスタキサンチン脂肪酸モノエステル、2分子の脂肪酸が結合しているアスタキサンチン脂肪酸ジエステルとして存在している。例えば、オキアミやアメリカザリガニには遊離及びアスタキサンチンの脂肪酸ジまたはモノエステルが、またファフィアやヘマトコッカスなど微生物の産生するアスタキサンチンは、そのほとんどが遊離アスタキサンチンで

ある（食品と開発第27巻（No. 3），第38頁，1992年）。アスタキサンチンの酸素や熱・光に対する安定性はアスタキサンチン脂肪酸ジまたはモノエステルの方が遊離アスタキサンチンに比べて安定である。腸管における吸収効率はアスタキサンチン脂肪酸ジまたはモノエステルの方が遊離アスタキサンチンよりも優れている（食品と開発第27巻（No. 3），第38頁，1992年）。一重項酸素の消去能やフリーラジカル及び活性酸素の捕捉・消去活性は遊離アスタキサンチンのみで発現し、アスタキサンチン脂肪酸ジエステルにこの効果はない（Food Style 21，第1巻，第73頁，1997年）。しかしながらアスタキサンチン脂肪酸ジまたはモノエステルは腸管吸収時に酵素によって加水分解され、体内で遊離アスタキサンチンとなり、一重項酸素の消去や活性酸素の捕捉・消去効果が発揮される（食品と開発，第27巻（No. 3），第38頁，1992年）。油脂への溶解性は、エステル型の方が優れている。遊離アスタキサンチンが50ppm程度しか溶けないのに対して、エステル型のアスタキサンチンは100ppm程度でも容易に溶けるので食品、医薬品への用途展開が広がる。このため、アスタキサンチンの持つ生体内での抗酸化効果を期待してアスタキサンチン脂肪酸ジエステルを経口摂取することには何ら問題はないと考えられている。

【0006】アスタキサンチン脂肪酸ジエステルは、前記のように有用であり、しかも安定性が高く吸収効率が良く、医薬品や食品の分野で応用が期待できるが、その製造法についての報告は少ない。天然資源から分画してアスタキサンチンの脂肪酸エステルを製造する方法として例えば、オキアミの抽出物から高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す。）を用いて分画することが知られているが（特開平7-300421号公報）、この場合オキアミ由来の臭気を除くことはできず、前記アスタキサンチン脂肪酸エステルは、食品、医薬品、化粧品の原料としては好ましくない。HPLCで分画されたアスタキサンチン脂肪酸ジエステルを水蒸気蒸留する方法や活性炭・活性白土など吸着剤を用いる既知の脱臭方法を行った場合には、アスタキサンチンは分解あるいは吸着され、その含有率は著しく減少し、効果を十分発揮できない。微生物由来のアスタキサンチンを抽出する際には、微生物の細胞壁を破碎する必要があるために、アスタキサンチンの抽出効率が悪い問題がある。また、含有されるアスタキサンチンもそのほとんどが遊離アスタキサンチンであり、アスタキサンチン脂肪酸ジまたはモノエステルを得るには適当な原料ではない。また、遊離アスタキサンチンの化学合成法についての報告は数多くなされているが、アスタキサンチン脂肪酸ジまたはモノエステルの化学的な合成法についての報告はない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、医薬

品や食品の分野で応用が期待でき、しかも安定で吸収効率が低い脂肪酸ジエステル型アスタキサンチンを効率的に合成する方法を提供するものである。

【0008】

【発明を解決するための手段】本発明者らは、前記の問題点に鑑み、アスタキサンチン脂肪酸ジエステルの合成方法を鋭意検討した結果、脂肪酸と遊離アスタキサンチンあるいはアスタキサンチン脂肪酸モノエステルと脂肪酸とからアスタキサンチン脂肪酸ジエステルを合成するに際して、酵素であるリパーゼを用いると収率よく合成できる知見を得て、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、次の（1）～（6）である。

（1）アスタキサンチンと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際してリパーゼを用いることを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

（2）脂肪酸が炭素数14～22の直鎖または分岐の飽和もしくは不飽和の脂肪酸である前記のアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

（3）リパーゼがカンジダ属の微生物由来のリパーゼ、クロモバクテリウム属の微生物由来のリパーゼ、動物の脾臓由来のリパーゼから選ばれる1種以上を用いる前記のアスタキサンチン脂肪酸モノエステルまたはアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

（4）アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際してリパーゼを用いることを特徴とするアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

（5）アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際して、脂肪酸が炭素数14～22の直鎖または分岐の飽和もしくは不飽和の脂肪酸である前記のアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

（6）アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルと脂肪酸を用いてエステル化反応を行うに際して、リパーゼがカンジダ属の微生物由来のリパーゼ、クロモバクテリウム属の微生物由来のリパーゼ、動物の脾臓由来のリパーゼから選ばれる1種以上を用いる前記のアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの製造方法。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明で用いる原料のアスタキサンチンは、遊離アスタキサンチンやアスタキサンチン脂肪酸モノエステルであり、単品でもあるいは両者の混合物であってもよい。遊離アスタキサンチンは化学合成によって得られたものでも、前記のように抽出等により得られる天然物を用いてもよい。天然物のアスタキサンチンとしては、遊離アスタキサンチンあるいはアスタキサンチン脂肪酸モノエステルはファフィアやヘマトコッカスなど微生物が産生した油脂由来のアスタキサンチン、

さらには、エビ、カニ殻、オキアミなど甲殻類あるいは魚卵などから抽出分画されたアスタキサンチン類などが挙げられる。また、前述の微生物や甲殻類などから生産された遊離、脂肪酸モノエステル、脂肪酸ジエステルの各アスタキサンチンが混在したものをを用いることができる。

【0010】本発明で用いる原料の脂肪酸は、炭素数が14～22の直鎖または分岐の飽和あるいは不飽和脂肪酸が好ましい。具体的には例えば、バルミチン酸、イソバミチン酸、ステアリン酸、バルミトオレイン酸、オレイン酸、パルセン酸、エライジン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸(γ -LN)、共役リノール酸(CLA)、ビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸(AA)、イコサペンタエン酸(EPA)、ドコサペンタエン酸(DPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)などから選ばれる脂肪酸または2種以上の混合脂肪酸が挙げられる。さらに、ハエカビ類(Entomophthoraceae属)、海洋微細藻類(Isochrysis属)、ケカビ類(Mortierella属)などの微生物油;オリーブ油、菜種油、紅花油、ヒマワリ油、トウモロコシ油などの植物油;イワシ油、カツオ油、マグロ油、鯨油、イカ肝油、タラ肝油、サメ肝油、魚卵油など海産動物油;あるいは卵黄油から精製濃縮して得られる混合脂肪酸や精製した脂肪酸を用いることができる。

【0011】本発明で用いるリパーゼは、カンジダ属の微生物由来のリパーゼ(Candida cyndraceae由来のリパーゼ(名糖産業(株)商品名:リパーゼOF)、Candida Antaretica由来のリパーゼ(ノボインダストリー(株)商品名:リパーゼSP382))、クロモバクテリウム属の微生物由来のリパーゼ(Chromobacterium viscosum由来のリパーゼ、旭化成工業(株)商品名:リパーゼAC)、動物の脾臓由来のリパーゼ等のリパーゼが好ましく挙げらる。微生物由来のリパーゼとしては、前記の他に、糸状菌(Aspergillus niger)由来あるいはシュードモナス属(Pseudomonas属)のリパーゼが挙げられる。また動物の脾臓由来のリパーゼとしては、豚脾臓由来のアルドリッチ社製の市販品を挙げることができる。これらのリパーゼから選ばれる一種、あるいは二種以上のリパーゼを用いてもよい。

【0012】本発明で用いるリパーゼは、粉末あるいは担体に固定化した固定化リパーゼが用いることができる。リパーゼの固定化方法は公知の方法によって行われ、固定化担体としてシリカゲル、セライト、 κ -カラギナン、キチン、アルギン酸ナトリウムなど公知の担体(バイオリアクター 福井三郎監修・編 講談社サイエ

10

20

30

40

50

食品化学新聞社(1990年)が用いられる。

【0013】本発明で用いるアスタキサンチンと脂肪酸のモル比は、遊離アスタキサンチンに対して2(～20倍モルの脂肪酸であり、好ましくは5～10倍モルである。2倍モルより少ない場合は高いアスタキサンチン脂肪酸ジエステルの含量得られず、20倍モルより多くしても著しい効果の向上は期待できないので好ましくない。

【0014】本発明で用いるリパーゼの量は、アスタキサンチンに対して100u(=単位)/mmol～5000u/mmol、好ましくは500～3000u/mmolであり、100u/mmolより少ないと、アスタキサンチン脂肪酸ジエステルを高収率で得られず、5000u/mmolより多く使用しても著しい効果の向上は期待できないので好ましくない。

【0015】本発明のエステル化の反応温度は、20～50℃が好ましく挙げられる。本来酵素反応においては、それぞれの酵素リパーゼの持つ至適温度や至適pH等の条件において行うことが好ましい。しかしながら、反応温度が50℃より高いと反応に用いる原料の遊離アスタキサンチンの劣化が促進されるので好ましくない。また、反応温度が20℃より低いとリパーゼの活性が落ち、反応速度が遅くなるために好ましくない。

【0016】本発明では反応時に有機溶媒を用いても差し支えない。反応時のリパーゼの安定性から無極性溶媒が好ましい。具体的には例えば、 n -ヘキサン、ベンゼン、四塩化炭素などが挙げられる。これらの溶媒を用いることができるが、毒性など安全性の面から n -ヘキサンが好ましく挙げられる。特にバルミチン酸やステアリン酸など融点が高い飽和脂肪酸を反応に用いる場合には有効である。

【0017】本発明で行う酵素反応の反応時間は12時間から48時間が望ましい。反応時間が12時間より短いと反応が充分進まず、また、反応時間が48時間を超えても著しい純度の向上したアスタキサンチン脂肪酸ジエステルを得ることはできないので好ましくない。本発明では脂肪酸及びアスタキサンチンの酸化劣化反応を防ぐために窒素やアルゴンなど不活性ガス気流下で行うことも好ましく挙げられる。

【0018】本発明における反応は可逆的平衡反応のために、反応の進行に伴って生成する水分が反応を妨げる要因になる。本発明においては反応時における水分含量は200ppm～1000ppmが望ましい。水分含量が1000ppmより多いと反応の中心が合成反応から分解反応に移り、アスタキサンチン脂肪酸ジエステルの純度は低くなり好ましくない。水分含量が200ppmより少ないとリパーゼが安定に存在するために持っている水和水までも除去することになり、リパーゼが不活性化してしまうので好ましくない。この副生する水を除去するために、有機溶剤を用いない場合には不活性ガスで

バブリングあるいは真空によって蒸散せしめるか、あるいは有機溶媒を用いる場合にはモレキュラシーブスなどで吸着除去することなどを行うことが好ましい。

【0019】

【発明の効果】本発明のアスタキサンチン脂肪酸エステルの製造方法は、リパーゼを用いるので温和な条件下で反応することができ、原料のアスタキサンチンの分解などを引き起こすことなく高い収率でアスタキサンチンの脂肪酸エステルを製造することができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例に基づいて、本発明を詳細に説明する。次に用いた測定方法を示した。

<担体なしのリパーゼ活性の測定方法>リパーゼのエステル合成活性は次の方法により定めた。オレイン酸（純度99%：日本油脂（株）製エキストラオレイン）1mol及び水分含量10%のグリセリン1molの混液に100μLの酵素水溶液を添加し、37℃で500rpmで10分間かき混ぜた時のオレイン酸の減少量より算出した。1分間に1μmolのオレイン酸を消費する活性を1u（＝単位）とした。

<固定化リパーゼ活性の測定方法>リパーゼのエステル合成活性は次の方法により定めた。オレイン酸（純度99%：日本油脂（株）製エキストラオレイン）1mol及び水分含量10%のグリセリン1molの混液に10mlのn-ヘキサンに溶解し、ここに1gの固定化リパーゼを添加し、37℃で500rpmで10分間かき混

表1

リパーゼ略号		OF	SP	AC	脾
商品名または市販品		リパーゼOF	リパーゼSP382	リパーゼAC	リパーゼII
製造会社または販売会社		名糖産業（株）	ノボインダストリーズ	旭化成工業（株）	アルドリッチ
酵素の由来		Candida Cylindracea	Candida Antarctica	Chromo-bacterium viscosum	豚脾臓
エステル合成活性（u）		3800	300	2000	1500
担体 * 注1	有無	あり	あり	なし	なし
	種類	キトパール	不明**	セライト	セライト

注1*：担体のあるものおよびないものの両方示した。

**：市販品で不明のもの

注：担体のあるもの、およびないものも示した。担体のあるものは次の方法により固定化リパーゼを作成した。

<セライトに固定化リパーゼ>前記の方法で測定して合成活性が1000uに相当する重量のリパーゼを20mlの精製水に溶解した。このリパーゼ水溶液を100gのセライト535（関東化学（株）社製）と混和して固

* ぜた時のオレイン酸の減少量より算出した。1分間に1μmolのオレイン酸を消費する活性を1u（＝単位）とした。

<アスタキサンチンの分析方法>アスタキサンチンの含量の分析は高速液体クロマトグラフィーを用い以下に示す条件で行った。

機種：高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略す、Cica-Merck社製のHibar column LiChrosorb Si 60のカラムを装着した東ソー（株）社製、8020システム）、移動相：n-ヘキサン：酢酸エチル：酢酸＝50：50：1（v：v：v）

流量：2ml/min

検出方法：紫外可視吸収スペクトル492nm。

前記の条件において分析した結果、アスタキサンチン脂肪酸ジエステル、アスタキサンチン脂肪酸モノエステル、遊離アスタキサンチンはそれぞれ保持時間2.3、3.9および5.2分付近に検出される。この3種類のアスタキサンチンのピーク面積の合計を100重量%として、それぞれのピーク面積比をアスタキサンチン脂肪酸ジエステル、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルおよび遊離アスタキサンチンのそれぞれの組成比（重量%）として算出した。次に実施例に用いた酵素リパーゼのエステル合成活性を表1に示した。

【0021】

【表1】

定化を行った。固定化後リパーゼ水溶液とセライトの混和物を2日間25℃で風乾した後、8時間真空乾燥して固定化リパーゼとした。

<キトバールによる固定化リパーゼ>50g（湿重量）のキトバールを400mlの12%グルタルアルデヒドに懸濁し、0℃で60分間かき混ぜた。十分な精製水でグルタルアルデヒドを洗浄除去した後、前記の方法で測

定した合成活性が1000uに相当する重量のリパーゼを100mlの精製水に溶解したリパーゼ水溶液を混和して37℃、30分間かき混ぜて固定化を行った。固定化後リパーゼの混和物を2日間25℃で風乾した後、8時間真空乾燥して固定化リパーゼとした。

【0022】実施例1

遊離アスタキサンチン（ロッシュ社）0.12g（0.2mmol）及び遊離脂肪酸としてオレイン酸0.282g（1.0mmol）を反応用ガラス瓶にとった。ここにカンジダ属由来のリパーゼOFを500uを加え、かき混ぜながら反応した。24、48時間反応した後、この溶液をとり、HPLCによってアスタキサンチンの組成比を分析した。結果を表2に示した。

【0023】実施例2-8

表2および表3に示したように、遊離アスタキサンチンの添加量及び遊離脂肪酸の種類、添加量、使用したリパーゼの種類及び量、固定化の有無、溶剤の使用の有無、反応温度などの条件を変えた以外は実施例1に準じて反応を行って、HPLCによりアスタキサンチンの組成比*

*を分析した。結果を表2および表3に示した。

【0024】実施例9

エビ殻より抽出した下記の組成のアスタキサンチン溶液（注1；日本キレート社製）20gとn-ヘキサン100mlを反応用のガラス容器にとり、リパーゼSP382を2000u加え、40℃に加温し、かき混ぜた。24、48時間後にこのアスタキサンチンヘキサン溶液を採り、HPLCによってアスタキサンチンの組成比を分析した。注1；アスタキサンチン溶液：アスタキサンチン類の重量比は全溶液の約0.2%である。また、その中でアスタキサンチン類の組成比はアスタキサンチン脂肪酸ジエステルが25重量%、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルが重量5%、遊離アスタキサンチンが70重量%であった。アスタキサンチン類の他には約85重量%の遊離脂肪酸、約15重量%のトリグリセライドが含まれている。

【0025】

【表2】

		実 施 例				
		1	2	3	4	5
反 応 条 件	アスタキサンチン(a) (mmol)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	脂肪酸(b) 種類と量 (mmol)	OA 1.0 (99%)*	LA 2.0 (99%)*	EPA 1.0 (99%)*	DHA 2.0 (85%)*	γ -LNA 3.0 (90%)*
	リパーゼの 種類と活性	OF 500	OF 1000	SP 500	SP 3000	AC 2000
	リパーゼの 担体	なし	キトバール	不明	不明	セライト
	溶媒 種類と量(ml)	なし	n-ヘキサン 20	n-ヘキサン 30	n-ヘキサン 50	n-ヘキサン 30
	モル比(a/b)	2/10	2/20	2/10	2/20	5/30
	窒素ガスの 有無	あり	なし	なし	なし	なし
	反応温度(℃)	40	25	30	40	50
分 析 結 果 %	24時間後 ジエステル	50	49	22	32	38
	モノ エステル	18	4	36	27	19
	アスタキ サンチン	34	47	42	41	43
	48時間後 ジエステル	61	55	53	56	57
	モノ エステル	8	2	7	10	1
	アスタキ サンチン	31	43	40	84	42

注*脂肪酸の純度を示す。

【0026】

【表3】

11
表3

		実 施 例			
		6	7	8	9
反 応 条 件	アスタキサンチン(a) (mmol)	0.5	0.5	0.5	0.07
	脂肪酸(b) 種類と量 (mmol)	AA 5.0 (90%)*	PA 3.0 (95%)*	CO 5.0 (99%)*	SH** 2.0
	リパーゼの 種類と活性	AC 3000	脾 1000	脾 2000	AC 200
	リパーゼの 担体	なし	なし	セライト	不明
	溶媒 種類と量(ml)	なし	n-ヘキサン 50	n-ヘキサン 30	n-ヘキサン 100
	モル比(a/b)	5/50	5/30	5/50	7/567
	窒素ガスの 有無	あり	なし	なし	なし
	反応温度(℃)	45	35	35	40
分 析 結 果	24時間後 含量				
	ジエステル	46	29	27	45
	モノ エステル	15	35	38	31
	アスタキ サンチン	39	36	35	24
	48時間後 含量				
	ジエステル	56	49	52	67
	モノ エステル	11	15	25	13
	アスタキ サンチン	33	36	23	20

注：*脂肪酸の純度を示す。

**エビ殻より抽出した油脂由来の脂肪酸

【0027】注* 脂肪酸の略号は次のとおり。

OA：オレイン酸、LA：リノール酸、EPA：イコサペンタエン酸、DHA：ドコサヘキサエン酸、 γ -LNA： γ -リノレン酸、AA：アラキドン酸、PA：パルミチン酸、CO：トウモロコシ油より調整した脂肪酸

【0028】比較例1

遊離アスタキサンチン（ロッッシュ社）0.12g（0.2mmol）及び遊離脂肪酸としてオレイン酸0.28g（1.0mmol）、n-ヘキサン50mlを反応用ガラス瓶にとった。ここに通常のエステル化触媒としてパラトルエンスルホン酸（PTS）0.1gを加え、40℃でかき混ぜながら反応した。48時間反応した後、この溶液をとり、HPLCによってアスタキサンチンの組成比を分析した。その結果、アスタキサンチン脂肪酸ジエステル、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルに相当する保持時間2.3、3.9分付近にはピークが検出されなかった。原料のアスタキサンチンの保持時間5.2分のみピークが検出された。

【0029】比較例2

遊離アスタキサンチン（ロッッシュ社）0.12g（0.2mmol）及び遊離脂肪酸としてオレイン酸0.28g（1.0mmol）、n-ヘキサン50mlを反応用ガラス瓶にとった。ここに通常のエステル化触媒としてパラトルエンスルホン酸（PTS）0.1gを加え、68℃～70℃の還流下でかき混ぜながら反応した。8時間反応した後、この溶液をとり、HPLCによってアスタキサンチンの組成比を分析した。その結果、アスタキサンチンの組成比（重量%）はアスタキサンチン脂肪酸ジエステル、アスタキサンチン脂肪酸モノエステルおよび遊離アスタキサンチンに相当するそれぞれの保持時間2.3、3.9および5.2分付近に検出されなかった。反応終了後、アスタキサンチンを抽出してその濃度を測定したところ反応前に添加した21重量%まで減少していた。

【0030】実施例10

50 遊離アスタキサンチン（ロッッシュ社）0.12g（0.

2mmol)及び遊離脂肪酸としてオレイン酸0.282g(1.0mmol)を反応用ガラス瓶にとった。ここにカンジダ属由来のリパーゼOFを500uを加え、かき混ぜながら反応した。12時間反応した後にこの溶液をとり、HPLCによってアスタキサンチンの脂肪酸モノエステルのみを分取したアスタキサンチンの脂肪酸モノエステルを用いて、さらにリパーゼOFを500u

添加して24時間反応して前記と同様に分析した。その結果は、アスタキサンチンの脂肪酸ジエステルが80重量%であった。

【0031】以上の結果から本発明のリパーゼを反応に用いる方法は、収率よくアスタキサンチン脂肪酸ジエステルが合成できることがわかる。